

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Pacientes

A seleção da amostragem esteve na dependência do desencadeamento dos surtos reacionais em pacientes internados no Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru, SP.

Os pacientes selecionados foram avaliados clínica, imunológica, histológica e baciloscopicamente, de acordo com os critérios propostos no Congresso de Madrid¹². Dos 22 pacientes que integraram esta experimentação, 20 eram portadores de hanseníase virchoviana e 2 pertenciam ao grupo dimorfo.

Ao serem incorporados ao estudo, os pacientes foram esclarecidos sobre os propósitos dos procedimentos adotados, os quais são realizados com plena concordância dos mesmos.

Na época da experimentação, todos os pacientes se encontravam sob tratamento quimioterápico convencional para a hanseníase. Os dados relativos a algumas características do grupo e a medicação utilizada na vigência do surto estão expressos na Tabela 1.9

4.2. Estudo Histopatológico e Imunohistoquímico

As primeiras manifestações inflamatórias cutâneas, identificadas como próprias do ENH5 foram realizadas biopsias da região de lesão reacional. Em 12 casos precedeu-se também coleta de tecido em área livre de reação.

4.2.1. Coleta do Material

Os locais selecionados para o estudo foram biopsiados com "punch" cilíndrico de 05mm de diâmetro, apresentando 01 cm de profundidade. O material coletado da área com ENH foi identificado como segmento a e aquele obtido da área livre de reação como segmento a. Em um dos casos, foi enviado para exame histopatológico uma terceira biópsia, segmento c, com suspeita de fenômeno de Lúcio. Estas biopsias foram divididas em 2 fragmentos, para serem avaliados histopatológica e imunohistoquimicamente.

4.2.2. Análise Histopatológica

Um dos fragmentos teciduais foi fixado em forma uma por duas horas, transferido para álcool 70 e, em seguida, processado como usual para inclusão em parafina e microtomia. As secções obtidas foram coradas pela hematoxilina-eosina (H.E.)³¹ e pelo Fite-Faraco¹⁴

A avaliação baciloscopia empregou o índice descrito por RIDLEY (1977)⁶⁵ adaptado para este tipo de leitura.⁷⁵

A leitura histológica foi realizada de acordo com os critérios descritos a seguir:

Os achados microscópios foram anotados com auxílio de tabela onde nas ordenadas foram colocadas as alterações histopatológicas passíveis de serem observadas na hanseníase virchoviana durante os episódios de ENH, acrescidos da bacilos copia que incluem dados quantitativos, qualitativos e distribuição dos bacilos em algumas estruturas cutâneas. Nas abscissas foram colocados os números de ordem referentes as biópsias. Nos retângulos, produzidos pela interseção das linhas limitantes destes dados, foram anotados a presença (+) ou ausência (-) das alterações histopatológicas para a referida biópsia. Para algumas alterações histopatológicas passíveis de melhor quantificação subjetiva, a positividade foi desdobrada em discreta (+), moderada (++) e intensa (+++) tabela 3.

4.2.3. Análise Imunohistoquímica

O fragmento destinado a imunofluorescência foi lavado em solução fisiológica e embebido em O.C.T. (Optimal Cutting Temperature Medium, Tissue Tek-Miles Scientific), congelado em nitrogênio líquido até data da realização dos testes.

A pesquisa de IC foi realizada utilizando-se a técnica descrita por GOLDMAM (1968)²¹ com pequenas modificações.

Brevemente:

- cortes com cerca de 05 micra de espessura obtidos de blocos congelados com fragmentos das lesões foram colocados sobre lâmina histológica previamente tratada com solução de agar a 0,1% para evitar descolamento durante o processamento e postas para secar à temperatura ambiente.
- As seções foram delimitadas com esmalte e, a seguir, incubadas por 30 minutos a 37. C com antisoros humanos, conjugados com isotiocianato de fluoresceína, conforme Tabela 2,
- Incubação das laminae com salina tamponada Ph 7,2 por 10 minutos.
- Secagem ao ar frio e montagem das laminae em glicerina tamponada 0-1=9,5.

A identificação dos depósitos fluorescentes foi realizada em microscópio de fluorescência-ZEISS, modelo Standart, com epi-condensador de fluorescência IV F.L. objetiva 40X.

Tabela 1 - Dados referentes aos pacientes que participaram deste estudo e, medicação na vigência do surto.

Nº do Caso	Idade	Sexo	T.D.M. (meses)	Medicação do Surto
01	54	M	12	Th
02	42	F	240	Th
03	16	M	96	Th
04	39	M	180	Pr;Th
05	34	F	96	pe;Th
06	28	M	10	Pr
07	53	M	72	Pe
08	23	M	24	Pr;Th
09	14	M	60	Th
10	37	M	120	Th
11	79	M	60	Pr
12	53	M	96	Th
13	41	M'	72	Th
14	49	M	10	Th
15	73	M	216	Th
16	61	M	12	Th
17	21	F	60	Pe;Th
18	23	F	24	Pr
19	62	NI	04	Pe
20	43	F	72	Th
21	14	F	96	Th
22	45	M	72	Th

Abreviaturas utilizadas: M. masculino

f F . feminino

Th = talidomida

Pr . prednisona

Pc = prednisona

TDM. tempo de duração da moléstia.

Tabela 2 - Antisoros marcados com fluoresceína empregados na técnica de imunofluorescência direta.

Antisoro Especifico	Diluição	Fonte
anti IgT	1:60	Behring
anti IgG	1:60	Behring
anti IgM	1:10	Behring
anti CK	1:10	Behing
anti CA	1:10	Behing
anti C _{3c}	1:10	Hyland
anti Cici	1:10	Behing
anti Fi	1:10	Behring

Abreviaturas utilizadas: Ig = imunoglobulina-

IgT = imunoglobulina total

IgG = imunoglobulina G

IgM = imunoglobulina M

C3 = fração 3 do sistema complement()

C1 = fração 1 do sistema complemento

CK = cadeia kappa

C,X = cadeia lambda

F1 = fibrinogenio